

желудке и 12-перстной кишке, а клинически у них преобладали симптомы гипокинетического характера (склонность к запорам, вздутие живота и др.).

Выявленная нами NO-ЗДЭ у обследованных детей может быть связана с явлениями первичной или вторично формируемой вегетативной дисфункции. Есть предположение, что она, в какой то мере, отражает активность воспалительного процесса при ХГДП у детей. Для этого необходимы дополнительные исследования. Полученные нами результаты свидетельствуют о формировании у части детей с ХГДП NO-зависимой дисфункции эндотелия, что необходимо учитывать при разработке мероприятий по индивидуальной реабилитации данной категории пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Максимович Н.А., Добродей М. А., Борисюк В. В., Масюк М. А. Методические подходы в диагностике NO-синтазной недостаточности эндотелия в клинической практике // Роль монооксида азота в процессах жизнедеятельности. - Минск.-1998. - С. 195-199.
2. Konturek S., Konturek P. Role of nitric oxide in the digestive systems // Digestion. - 1995. - Vol.56. - P. 1-13.
3. Kozawa K., Sarfeh I.J., Tarnawski A. et al. The role of nitric oxide in alcohol-induced injury to the portal hypertensive gastric mucosa // Hepatology. - 1993. - Vol.23. - P. 930A.

РОЛЬ ЭНДОТЕЛИЯ В УСИЛЕНИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ КРОЛИКА И ЧЕЛОВЕКА ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Гурковская А.В., Плиски А.И., Бурый В.А., Гокина Н.И.

Институт физиологии им.акад. А.А.Богомольца НАН Украины, Киев

Клинические и экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что в участках кровеносных сосудов, пораженных атеросклерозом, наиболее часто локализуются спастические реакции. Последние сопровождаются нарушениями кровообращения с возникновением ряда сосудистых заболеваний. Среди причин вазоспазма наиболее существенными являются уменьшение эндотелийзависимого расслабления и увеличение чувствительности гладкомышечных клеток (ГМК) к сосудосуживающим агентам, в том числе и к серотонину [1,2,3]. Однако до конца неясно: возникающие изменения обусловлены нарушениями целостности эндотелия с

последующим уменьшением синтезированных им же биологически-активных веществ; изменениями со стороны электромеханических свойств ГМК; комбинацией данных факторов. Обусловлено это тем, что ни одна из экспериментальных моделей атеросклероза не может полностью воссоздать все компоненты возникающих нарушений.

Целью настоящей работы было проведение сравнительных исследований действия различных концентраций K^+ и серотонина на ГМК аорты кролика в контроле и в условиях экспериментального атеросклероза, а также подколенной артерии человека пораженной атеросклерозом. Предполагалось, что ответы ГМК на действие ионов калия будут служить показателем функционального состояния кальциевой проводимости и чувствительности сократительного аппарата ГМК к ионам кальция.

Материалы и методы исследований

Опыты проведены на 22 кроликах одного возраста породы (шиншилла) весом 2,5-3 кг. Одна группа животных (12 кроликов) получала атерогенную диету. Каждый день через зонд им вводили холестерин, разведенный в 3 мл подсолнечного масла (0,25 г/кг массы животного) на протяжении 12 недель. Контрольная группа животных (10 кроликов) получала обычный рацион. О развитии атеросклеротического поражения аорты свидетельствовало появление характерных жировых пятен на эндотелиальной поверхности сосуда. Эксперименты проводили на циркулярных мышечных полосках грудного отдела аорты кроликов. Длина полосок составляла около 10 мм, ширина - 0,6-0,7 мм. Тестом на функциональную способность эндотелия было значительное уменьшение сокращения мышечной полоски, вызванное серотином, на действие ацетилхолина. Дезэндотелизацию осуществляли механическим способом.

Циркулярные мышечные полоски подколенной артерии человека получали после ампутации нижних конечностей обусловленной осложненным облитерирующим атеросклерозом. Перед приготовлением мышечных полосок кровеносные сосуды очищали от окружающих тканей. Со стороны интимы осторожно удаляли отложения в виде сплошного аморфного пласта толщиной 2-3 мм. Мышечные полоски имели длину около 10 мм и ширину 1,0-1,5 мм.

Электрические реакции исследовали методом сахарозного мостика. Сократительную активность мышечных полосок регистрировали в режиме близкому к изометрическому с помощью механотрона (6Мх1С). Одновременная регистрация электрической и сократительной активности проводилась на диаграммной ленте автоматического потенциометра КСП. В экспериментах использовали стандартный раствор Кребса, рН которого составлял 7,4, температура - 36,5 ° С. Для повышения концентрации K^+ в

тестирующий раствор добавляли сухую соль хлористого калия в необходимом количестве. Также использовали серотонин креатинин серноокислый (Reanal) и ацетилхолин-хлорид.

Результаты и их обсуждение

ГМК аорты контрольных и животных с экспериментальным атеросклерозом в стандартном растворе Кребса не проявляли спонтанной электрической и сократительной активности. Повышение концентрации K^+ в растворе Кребса до 15-20 мМ сопровождалось дозозависимой деполяризацией и сокращением ГМК аорты контрольных животных и животных после атерогенной диеты. Но, в отличие от контрольных животных, полоска аорты пораженная атеросклерозом отвечала сокращением на повышение K^+ в растворе до 10 мМ. Исследование зависимости сокращения мышечных полосок от концентрации K^+ показало, что кривая доза-эффект в условиях атеросклероза сдвинута в сторону низких концентраций K^+ . Средняя эффективная доза также уменьшилась с 22 мМ в контроле до 18 мМ - при атеросклерозе. Необходимо также отметить, что дезндотелизация полосок, полученных от контрольных животных, сопровождалась похожими изменениями в сокращении, как и при атеросклерозе. Это позволяет предположить, что возникающие изменения сократительной активности ГМК, по крайней мере, на ранних стадиях развития атеросклероза, обусловлены изменениями в эндотелиальной функции. Подтверждением данного предположения являются эксперименты с изучением влияния серотонина на интактные и дезндотелизованные мышечные полоски аорты кролика в условиях атерогенной диеты. Кривые доза-эффект для сократительных реакций на серотонин в этих условиях свидетельствуют об отсутствии существенных отличий между величинами сокращений.

Действие серотонина в концентрациях ниже 50 нМ не сопровождалась изменениями мембранного потенциала ГМК и сокращениями полосок в контроле. В более высоких концентрациях серотонин вызывал деполяризацию мембраны и дозозависимое сокращение мышечных препаратов. На фоне деполяризации мембраны возникали потенциалы действия, которые сопровождалась фазными сокращениями мышечной полоски.

В случае атерогенной диеты минимальная эффективная концентрация серотонина уменьшалась на порядок по сравнению с контролем. Действие серотонина в концентрациях 10-50 нМ сопровождалось дозозависимой деполяризацией мембраны ГМК и сокращением мышечной полоски. Максимальная деполяризация, вызванная серотонином, составляла в среднем 3,1 мВ и достоверно не отличалась от значения, полученного для ГМК аорты

контрольных животных. На фоне деполяризации, вызванной серотином в концентрациях 0,1-5 мкМ, как и в контроле, наблюдалось возникновение потенциалов действия. Следует отметить, что частота потенциалов действия была достоверно выше в условиях атеросклероза (14 имп/мин), чем в контроле (6 имп/мин). Возникновение потенциалов действия возможно, обусловлено частичным торможением серотином калиевой проводимости клеточной мембраны, поскольку небольшая деполяризация ГМК ионами калия (10-15 мМ) не сопровождается возникновением потенциалов действия.

Кривые доза-эффект, полученные при исследовании действия серотонина на ГМК аорты контрольных животных и с экспериментальным атеросклерозом, показали, что средняя эффективная доза серотонина уменьшилась от 0,36 мкМ в контроле до 0,18 мкМ в условиях атеросклероза. Чувствительность ГМК к более низким дозам возрастала еще в большей степени. В пользу предположения, что наблюдаемые изменения реакций ГМК при атеросклерозе касаются, прежде всего, эндотелийзависимой функции сосудов являются данные, полученные при исследовании влияния ацетилхолина на реакции, вызванные серотином. Так в условиях контроля при интактном эндотелии на фоне сокращения вызванного серотином, добавление ацетилхолина сопровождалось стойкой реполяризацией мембраны и расслаблением мышечной полоски. В то же время, в случае атерогенной диеты и с интактным эндотелием добавление ацетилхолина на фоне реакции, вызванной серотином, наблюдалась только кратковременная реполяризация мембраны и расслабление мышечной полоски с последующей деполяризацией мембраны и возникновением потенциалов действия, которые сопровождалась фазными сокращениями.

Исследования, проведенные на мышечных полосках подколенной артерии человека, пораженной атеросклерозом, показали, что даже небольшое, всего на 5 мМ увеличение концентрации ионов K^+ в тестируемом растворе, сопровождалось тоническим сокращением артерии. При увеличении концентрации ионов калия до 10-15 мМ на фоне тонического сокращения возникали периодические фазные сокращения. Дальнейшее повышение ионов калия (20-120 мМ) в тестируемом растворе вызывало фазно-тонические реакции. Максимальное сокращение мышечных полосок наблюдалось при действии K^+ в концентрации 100 мМ. Средняя эффективная доза составляла 20 мМ.

Серотонин в концентрациях 0,001-10 мкМ вызывал дозозависимое сокращение мышечных полосок подколенной артерии. Действие серотонина в низких дозах (0,001-0,005 мкМ) сопровождалось медленно нарастающим тоническим сокращением. В концентрациях 0,01-1,0 мкМ серотонин вызывал фазные сократительные реакции на фоне тонического сокращения мышечных

полосок. Максимальное сокращение мышечных полосок отмечено при действии серотонина в концентрации 1 мкМ. Средняя эффективная доза составляла 0,05 мкМ.

Добавление ацетилхолина на фоне сократительной реакции, вызванной серотонином (концентрации препаратов - 1 мкМ) приводило к дополнительному сокращению полоски артерии и никогда не наблюдалось уменьшение сокращения. Отсутствие эндотелий-зависимого расслабления на ацетилхолин в этих экспериментах можно объяснить нарушением эндотелия при снятии отложений с интимы сосудов, или тем, что клетки эндотелия утратили способность синтезировать и/или выделять расслабляющий фактор в условиях атеросклеротического поражения.

Проведенные исследования показали, что ГМК подколенной артерии в условиях атеросклеротического поражения характеризуются высокой чувствительностью к деполяризации ионами калия. Необходимо отметить, что ГМК исследованных до сих пор кровеносных резистивных сосудов различных экспериментальных животных отвечали сокращениями при действии K^+ в концентрации, которая превышала 10-15 мМ. В наших же исследованиях они сокращались в ответ на более низкие дозы: 5-10 мМ. Так же в наших исследованиях на аорте кролика выявлено увеличение чувствительности ГМК к деполяризации K^+ в условиях атерогенной диеты по сравнению с контролем. Таким образом, высокая чувствительность исследованной подколенной артерии человека к ионам K^+ , вероятно, обусловлена атеросклеротическим поражением сосуда.

Серотонин осуществляет прямое возбуждающее влияние, обусловленное активацией серотониновых рецепторов на мембране ГМК и косвенное тормозящее через освобождение расслабляющего фактора с клеток эндотелия. Поэтому выявленную нами гиперреактивность можно объяснить как уменьшением действия релаксирующего фактора, так и повышением чувствительности ГМК к действию серотонина. Последнее может осуществляться как на уровне серотониновых рецепторов мембраны ГМК, так и на уровне мембранных внутриклеточных механизмов, которые обеспечивают регуляцию сократительных процессов.

Для выяснения вклада мембранных факторов в увеличение чувствительности ГМК к серотонину в процессах атерогенеза мы изучили влияние атерогенной диеты на трансмембранные токи ГМК аорты кролика.

Опыты проводили patch-clamp методом на одиночных мышечных клетках, изолированных ферментативным способом с помощью коллагеназы. В стандартном растворе Кребса регистрировали исходный ток, который содержал два калиевых компонента - быстроинактивирующийся и задержанный. В бескальциевом цезий-содержащем растворе регистрировали

кальциевый входящий ток. Были полученные вольт-амперные характеристики всех компонентов и инактивационные характеристики выходящего и входящего компонентов трансмембранного тока, который инактивировался. Показано, что серотонин в концентрации 1 мкМ, которая вызывала максимальное сокращение, не влиял на входящий кальциевый ток, но увеличивал быстрый выходящий ток. При сравнении вольтамперных и инактивационных характеристик выходящего и входящего компонентов трансмембранного тока в ГМК контрольных и пораженных атеросклерозом кроликов не было выявлено достоверных отличий. Кроме того, при действии серотонина мы не обнаружили возможного увеличения амплитуды потенциалов действия ГМК сосудов, пораженных атеросклерозом. Полученные данные позволяют предположить, что развитие атеросклероза, по крайней мере, на ранних стадиях, не приводит к нарушениям функционирования ионных каналов мембраны ГМК аорты.

Возможной причиной увеличения чувствительности ГМК к ионам калия и серотонину может быть уменьшение продукции эндотелийрасслабляющего фактора при атеросклерозе [1,2]. Известно, что серотонин, кроме возбуждающего действия вызывает эндотелий-зависимое расслабление ГМК больших коронарных артерий ряда животных и человека, а деэндотелизация этих сосудов сопровождается заметным сдвигом влево кривой доза-эффект для серотонина [3]. Деэндотелизация основной артерии сопровождается двух – трехкратным увеличением тонического компонента сокращения, вызванного гиперкалиевой деполяризацией [4]. Показано также, что при действии гиперкалиевого раствора происходит высвобождение фактора расслабления из клеток эндотелия бедренной артерии [5]. Имеются данные о повышении тонуса некоторых кровеносных сосудов при разрушении эндотелия и наблюдаемой в этих условиях деполяризации ГМК [3].

Результаты наших исследований показали, что усиление реакций мышечных полосок кровеносных сосудов на серотонин и гиперкалиевую деполяризацию в условиях атеросклероза может быть связано с нарушением функции эндотелия, который является источником ряда сосудодетивных веществ, в частности, окиси азота, опосредующего расслабление кровеносных сосудов и обеспечивающего компенсаторный механизм, который поддерживает периферическое сопротивление на пониженном уровне. Развитие атеросклероза сосудов у человека сопровождается, по-видимому, подобными изменениями их функционального состояния, что и у животных с таким же экспериментальным заболеванием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Guerra R., Brotherton A.F.A., Goodwin P.J. et al. Mechanisms of abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in atherosclerosis; implications for altered autocrine and paracrine functions of EDRF//Blood vessels.-1989.-26.-N 5.-P.300-314.
2. Kauser K., da Cunha V., Fitch R., Mallari C., Rubanyi G.M. Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. //Am.J.Physiol. Heart Circ.Physiol.-2000.-May.-278 (5):H1679-H1685.
3. Marshall J.J., Kontos H.A. Endothelium-derived relaxing factors. A perspective from in vivo data//Hypertension. -1990. -16.-N 4.-P.371-386.
4. Nishie E., Nakao T., Itoh T., Kuriyama H. Factors inducing endothelium-dependent relaxation in the guinea-pig basilar artery as estimated from the actions of haemoglobin//Brit. J. Pharmacol. -1989. -96.-N 3. -P. 645-655.
5. Rubanyi G.M., Vanhoute P.M. Potassium-induced release of endothelium-derived relaxing factor from canine femoral arteries//Circulat.Res.-1988.-62.-N 6.-P. 1098-1103.

ОЦЕНКА СТИМУЛИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ NO В ЭНДОТЕЛИОЦИТАХ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ В ОТВЕТ НА УСИЛЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ НАПРЯЖЕНИЯ СДВИГА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ВЕЛОЭРГОМЕТРИИ

Дорошенко А.С., Солодкова И.В., Солодков А.П., Шебеко В.И., Телепнева Т.В.¹

*Витебский государственный медицинский университет,
Витебская областная клиническая больница¹, Витебск*

Велоэргометрическая проба широко используется для исследования функционального состояния сердца и сосудов. При этом оценивается изменение электрокардиограммы, величины кровяного давления и частоты сердечных сокращений. В то же время результат этой пробы зависит от чувствительности сердца и сосудов к возрастанию скорости кровотока, концентрации в крови эндогенных катехоламинов и других вазоактивных субстанций. Структурой сосудистой стенки, воспринимающей эти стимулы, является эндотелий, способный реагировать на напряжения сдвига, создаваемые потоком крови в артериальных сосудах, и отвечать вывобождением вазодилататорных субстанций.